

Frankfurt 1982.

**Vermehrung typischer DNA-bindender Proteine
im Serum von Patienten mit malignem Melanom**

BERND GRÄFF

Aus dem Zentrum der Dermatologie und Venerologie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Abteilung für Dermatologie IV

(Leiter: Prof. Dr. med. G. Leonhardi)

Vermehrung typischer DNA-bindender Proteine
im Serum von Patienten mit malignem Melanom

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin

des

Fachbereiches Humanmedizin

der

Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Vorgelegt von

Bernd Gräff

aus Hähnlein

Frankfurt am Main 1982

Dekan : Prof. Dr. med. H.J. Müller
Referent : Prof. Dr. med. G. Leonhardi
Korreferent : Prof. Dr. med. Dr. med. dent. G. Frenkel
Mündliche Prüfung : 28.1.1982



<u>Inhalt</u>	<u>Seite</u>
1. Zusammenfassung	3
2. Einleitung	5
3. Aufgabenstellung	11
4. Material und Methoden	
4.1. Krankengut, Untersuchungsmaterial	12
4.2. Isolierung DNA-affiner-Proteine aus Humanserum	13
4.3. QAE-Sephadex-Chromatographie	15
4.4. Isolierung DNA-affiner-Proteine	17
4.5. Bestimmung der an Cellulose ge- bundenen DNA	18
4.6. Affinitätschromatographie mit DNA-Cellulose	19
4.7. Präparation der Plattengele und SDS-Plattengel-Elektrophorese	23
4.8. Proteinbestimmung	27
5. Ergebnisse	
5.1. Isolierung DNA-affiner-Proteine aus Humanserum	28
5.2. Der R_{MM} -Wert	30
5.3. Der R_{MM} -Wert der Kontrollseren	34
5.4. Der R_{MM} -Wert der MM-Patientenseren	38
5.5. Der R_{MM} -Wert von Patientenseren mit anderen Dermatosen	43
6. Diskussion	46
7. Literatur	52

Abkürzungen

BCG	= Bacillus-Calmette-Guérin
Bis	= Methylenbisacrylamid
BSA	= Rinderserumalbumin
CEA	= Carcinoembryonic antigen
DBP	= DNA bindende Proteine (DNA-affine-Proteine)
DNS (=DNA)	= Desoxyribonucleinsäure
DTIC	= Dimethyl Triazeno Imidazol Carboxamid
EDTA	= Äthylendiamintetraessigsäure
MG	= Molekulargewicht
MM	= Malignes Melanom
NaCl	= Natriumchlorid
NaOH	= Natriumhydroxid
OP	= Operation
OS	= Osteogenic Sarcoma
QAE	= Quaternäres Aminoäthyl
RNS (=RNA)	= Ribonucleinsäure
SDS	= Sodium Dodecyl Sulfate
TEMED	= Tetramethyläthylendiamin
TF	= Transfer Factor
Tris	= Tris (hydroxymethyl)-aminomethan

1. Zusammenfassung

Maibach (23) konnte in einer orientierenden Studie zeigen, daß in Seren von Patienten, die zur Zeit der Blutentnahme klinische Erscheinungen eines malignen Melanoms zeigten, DNA-affine-Proteine im MG-Bereich von 20.000 - 25.000 vorhanden sind. Eine Ergänzung dieses Ergebnisses gelang der Arbeitsgruppe Parsons et al. (9,15), die in Seren von Patienten mit verschiedenen Arten von malignen Tumoren eine erhöhte Konzentration eines DNA-affinen-Proteins nachweisen konnten.

Es handelt sich um ein DBP mit MG 135.000, das bei Lösung der Disulfidbrücken in die drei Untereinheiten mit MG von 74.000, 40.000 und 22.000 zerfällt. Immunochemische Analysen der Arbeitsgruppe Parsons et al. (9,15) deuten auf eine Variante der Komplement-Komponente C3 hin, sie nennen dieses DNA-affine-Protein daher C3DP.

Bezugnehmend auf die Resultate von Maibach (23) und Parsons et al. (9,15) ist die Zielsetzung dieser Arbeit, zu ergründen, ob es bestimmte DNA-bindende-Proteine gibt, die speziell in Seren von Patienten mit malignem Melanom vermehrt vorhanden sind.

Durch eine geringfügige Modifikation der Isolierungsmethode und einen standartisierten reproduzierbaren Arbeitsablauf wurde ein breiteres Spektrum an DBP erfaßt, das ca. 0,3 - 0,6 % aller Serumproteine darstellt.

Untersucht wurden Seren von 23 MM-Patienten und 19 Seren von Gesunden. Um die Seren direkt miteinander vergleichen zu können wurde ein relatives Maßsystem entwickelt, das sich an der Konzentration des DBP mit MG 22.000 orientiert.

Bei Auftrennung der DBP im 11% igen Polyacrylamid-SDS-Plattengel und nach densitometrischer Auswertung konnte sowohl in Seren von MM-Patienten als auch in Kontrollseren ein DNA-affines-Protein mit MG 22.000 festgestellt werden:

- 1) In den Kontrollseren konnte nur eine geringe Menge des DBP mit MG 22.000 festgestellt werden. Sämtliche Kontrollseren lagen mit ihrer Konzentration über einem bestimmten Grenzwert, der als Normalbereich angesehen wird.
- 2) In den Seren von MM-Patienten mit dem Tumor-Level II - V kommt dieses DBP in einer signifikant höheren Konzentration vor als in den Kontrollseren.
- 3) Die Menge des DBP mit einem MG von 22.000 lag bei Seren von Patienten mit einer generalisierten Dermatose bzw. einem Schweißdrüsenkarzinom im Normalbereich.
- 4) Die Seren von Patienten mit einem Talgdrüsenkarzinom und einem Basaliom enthielten eine erhöhte Konzentration des DBP mit MG 22.000, analog der Seren von MM-Patienten.

2. Einleitung

Das Melanom kann an jeder Stelle des Körpers auftreten, an dem Melanocyten vorhanden sind, d.h. auch in Teilen des Auges und den Leptomeningen. Die frühzeitige Metastasierung des malignen Melanoms macht es zu einem der bösartigsten Tumore im Bereich von Haut und Schleimhaut. Die Ätiologie des Melanoms ist, wie bei anderen Karzinomen, weitgehend unbekannt.

Eine Ursache für die Zunahme von Melanompatienten könnte eine verstärkte Exposition des Menschen zu Sonnenlicht sein. Das Ansteigen ist eng korreliert mit der veränderten Lebensart der Menschen in den letzten drei Jahrzehnten. So hat sich von 1945 bis 1971 die Mortalitätsrate bei Untersuchungen in Kalifornien verdoppelt, obwohl die Melanomdiagnostik verbessert wurde (1).

Histologisch entwickelt sich das maligne Melanom zu 80% aus einer präblastomatösen Melanose und zu 20% aus Naevuszellen-Naevi. Im Bereich der Naevuszellen-Naevi sind die Melanomzellen aus maligne entarteten epidermisständigen Melanocyten entstanden (2).

Die starke Neigung des Melanoms zur Metastasenbildung erfolgt zunächst lymphogen um den Primärtumor.

Nach regionärer Metastasierung erfolgt die hämatogene Metastasierung mit Absiedlungen in Lunge, Leber, Herz, Gehirn, Haut und Knochen.

Primärtumor und Grad der Metastasenausbreitung wird nach Sylven (3) in drei klinische Stadien eingeteilt:

Stadium I : Primärtumor ohne erkennbare Metastasierung

Stadium II : Primärtumor mit regionalen Lymphknotenmetastasen

Stadium III : Primärtumor mit Fernmetastasen

Seit 1969 wird nach einem Vorschlag von Clark et al. (4) eine histologische Klassifikation in drei Melanomentypen vorgenommen (Tab. I).

Tab. I

Melanomtyp und Abkürzung	Häufigkeit (5)	Überlebensrate 5 Jahre nach OP(5)
1. Lentigo-maligna-Melanom (LMM)	14 %	83 %
2. Superficial-spreading-Melanom (SSM)	46 %	66 %
3. Noduläre Melanom (NM)	41 %	51 %

Neben Stadium, Geschlecht, Melanomtyp, Lokalisation und dem Alter des Patienten ist besonders die histologische Invasionstiefe für die Prognose des Tumors entscheidend (49-56). Aufgrund dieser Beobachtung wird das infiltrierende Wachstum des MM nach Clark (5) in fünf Kategorien eingeteilt:

Level 1: Das MM ist intraepidermal lokalisiert.

Level 2: Das MM dringt in das Stratum papillare ein.

Level 3: Das MM durchdringt das Stratum papillare.

Level 4: Das MM dringt in das Stratum reticulare ein.

Level 5: Das MM dringt in die Subcutis ein.

Für die maligne Wachstumsrichtung der drei Melanomentypen gibt es Unterschiede (6).

So ist den beiden Melanomentypen SSM und LMM ein Wachstum in zwei aufeinanderfolgenden Schritten gemeinsam. Es beginnt mit der Wachstumsrichtung horizontal zur Hautoberfläche, die Monate und Jahre andauern kann. Erst im zweiten Schritt erfolgt ein Wachstum vertikal zur Hautoberfläche. An einer Stelle des meist flächenhaft ausgebreiteten Primärtumors erfolgt eine knopfförmige Vorwölbung, ein exophytisches und endophytisches Wachstum.

Der dritte Melanomtyp, das noduläre Melanom, wächst gleichzeitig senkrecht sowie waagrecht zur Hautoberfläche. Durch das frühe invasive Wachstum des nodulären Melanoms und die damit verbundene Metastasenausbreitung, hat dieser Melanomtyp die schlechteste Überlebensrate nach 5 Jahren (Tab. I). Hinzu kommt außerdem, daß das NM mit 27 % die höchste Fehldiagnose hat, gegenüber LMM mit 17 % und SSM mit 21 % (7).

Da das Melanom ein röntgen-unsensibler Tumor ist, ist eine rasche operative Entfernung mit ausreichendem Sicherheitsabstand angezeigt. Zuvor kann im Zweifelsfall durch eine Excision die Diagnose histologisch gesichert werden.

Die therapeutischen Maßnahmen zur Rezidivprophylaxe und zur Behandlung regionaler Metastasen konnte noch nicht vereinheitlicht werden. Dies liegt in erster Linie an der relativ geringen Zahl an Melanompatienten, die jedem Untersucher zur Verfügung steht. Darüberhinaus muß bei der Wahl der Therapie nach den verschiedenen Parametern einer Melanomerkrankung, wie Stadium, Level, Melanomtyp, Alter usw., differenziert werden, was zu einer Verringerung symptomgleicher Melanompatienten führt und damit nur begrenzt eine statistische signifikante Aussage über die richtige Therapie zulässt.

Neben den verschiedensten therapeutischen Maßnahmen wird folgende Chemo- und Immunotherapie zumeist durchgeführt:

- a) Chemotherapeutisch wird bei Metastasen das Cytostatikum "Dimethyl Triazeno Imidazol Carboxamid" (DTIC) angewendet (25,26).
- b) Bei der immunotherapeutischen Behandlung wird der Impfstoff gegen Tuberkulose, das BCG (Bacillus-Calmette-Guérin) (27,28,29) sowie eine Behandlung nach dem Prinzip des Transferfaktors eingesetzt (30-38).

Je nach Invasionstiefe des Melanoms werden Chemo- und Immunotherapie parallel angewendet (39-41).

Da mit fortschreitender Erkrankung die Prognose immer schlechter wird, ist die Suche nach einem Indikator zur Diagnose und Früherkennung wichtig. Bisher konnten keine sicheren klinisch-chemischen Indikatoren gefunden werden, die Aufschluß über den Verlauf des MM und einer möglichen Metastasierung geben könnten.

In den letzten Jahren finden sich vermehrt Hinweise in der Literatur, daß DNA-affine-Proteine (DBP) im Humanserum einen malignen Tumor anzeigen können (9,10,12-22). Die Arbeitsgruppe von Parsons et al. (9,15) konnte in Seren von Patienten mit verschiedener Karzinomarten ein deutlich vermehrtes Auftreten eines bestimmten Serum-DBP nachweisen, das sie C3DP nannten. Darüberhinaus soll sich die Konzentration dieses Serumproteins parallel zu den klinischen Symptomen ändern.

War klinisch kein Fortschreiten der Malignität zu erkennen, verminderte sich die Konzentration dieses Proteins. Bei Rezidiven oder bei Mißerfolgen in der Therapie stieg die Konzentration im Serum wieder an.

Dieses DNA-affine Protein, C3DP genannt, hat ein Molekulargewicht (MG) von 135.000 und zerfällt bei Lösung der Disulfidbrücken in drei Untereinheiten mit MG von 74.000, 40.000 bzw. 22.000. Immunochemische Analysen sprechen für eine Variante der Komplement-Komponente C3, die eine zusätzliche Affinität zu der DNA besitzt.

Neben dem von Parsons et al. (9,15) beschriebenen DNA-affinen-Protein (C3DP) werden von anderen Arbeitsgruppen ebenfalls DNA-affine-Proteine genannt, die zur Früherkennung dienen sollen (17,18,20,21,22).

3. Aufgabenstellung

Nach Literaturberichten ist das DNA-affine-Serumprotein C3DP offenbar ein potentieller Indikator zur Früherkennung, Diagnose und Verlaufskontrolle bei den verschiedensten Karzinomtypen. Eine genauere Untersuchung ist noch notwendig, inwiefern dieser Indikator auf das maligne Melanom anwendbar ist.

Es soll daher analysiert werden, ob in den Seren von Patienten mit malignem Melanom in den klinischen Stadien I bis III und unterschiedlicher histologischer Tumor-Level, bestimmte DNA-affinen-Proteine vermehrt sind. Die Menge dieser Proteine soll gegenüber einer Kontrollgruppe gesunder Personen abgegrenzt werden.

Weiterhin sind stichprobenartige Seren von Patienten, die an anderen Hauttumoren bzw. generalisierten Dermatosen erkrankt sind, untersucht worden.

4. Material u. Methoden

4.1. Krankengut, Untersuchungsmaterial

Die Patienten gehören zum Krankengut des Zentrums der Dermatologie und Venerologie (ZDV) der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt am Main.

Untersucht wurden Seren von Patienten mit allen drei Melanomtypen und Stadien, insbesondere mit den histologischen Leveln III und IV (Tab.IV).

Die Patienten waren unterschiedlichen Alters und beiderlei Geschlechts. Gemeinsam war ihnen, daß die Seren entweder kurz vor oder bis maximal einen Monat nach der operativen Entfernung des Primärtumors entnommen wurden. Bei allen MM-Patienten war außer der Operation bei Blutentnahme noch keine therapeutischen Maßnahmen ergriffen worden. Außerdem wurden Seren aufgetrennt von Patienten mit anderen Karzinomarten und von zwei Patienten, mit generalisierten Dermatosen (Tab. V).

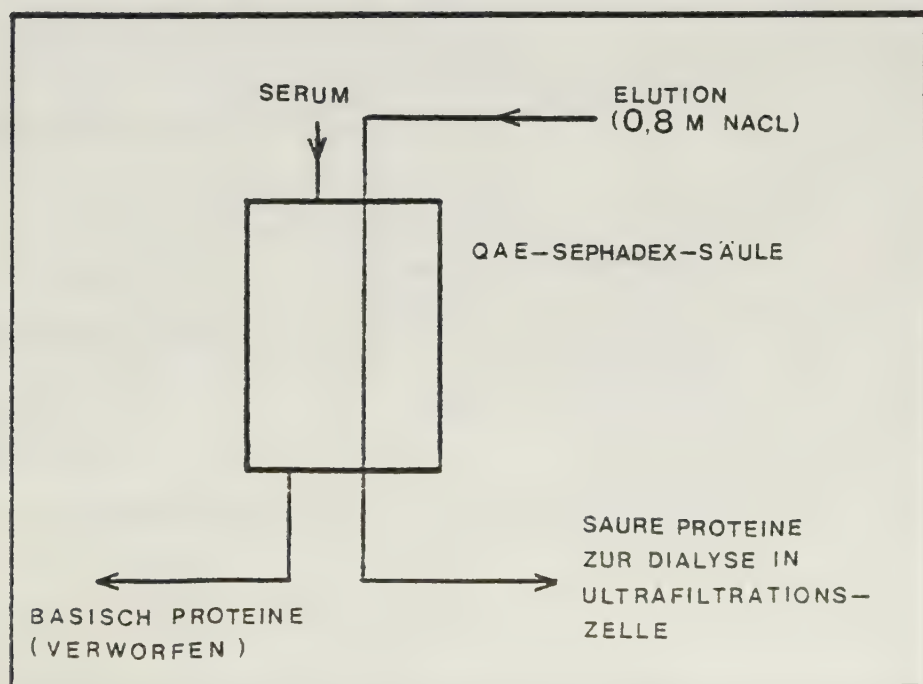
Als Kontrolle wurden die Seren 11 gesunder Erwachsener beiderlei Geschlechts und im Alter von 24-40 Jahren aufgetrennt. Einige Seren dieser Kontrollgruppe wurden mehrfach aufbereitet, so daß schließlich 19 Proben mit DNA-affinen-Proteine von Gesunden vorlagen (Tab.II).

4.2. Isolierung DNA-affiner-Proteine aus Humanserum

Brehm und Hoch fanden, daß sich verschiedene Serumproteine an DNA binden können (42,43). Da sich ebenfalls positiv geladene Immunglobuline unspezifisch an DNA binden, müssen diese zuvor entfernt werden (44). Das geschieht durch Chromatographie des Serums mit dem Anionenaustauscher QAE-Sephadex (Pharmacia). Hierbei werden negative Serumproteine an den positiven geladenen Gruppen des QAE-Sephadex fixiert. Die ungebundenen positiven Proteine werden ausgewaschen und verworfen. Die gebundenen negativen Proteine werden durch einen Elutionspuffer abgelöst und anschließend dialysiert (Abb. 1).

Mit dem 7-fachen Volumen an Puffer der folgenden Affinitätschromatographie wird das QAE-Eluat kontinuierlich in einer Ultrafiltrationszelle dialysiert.

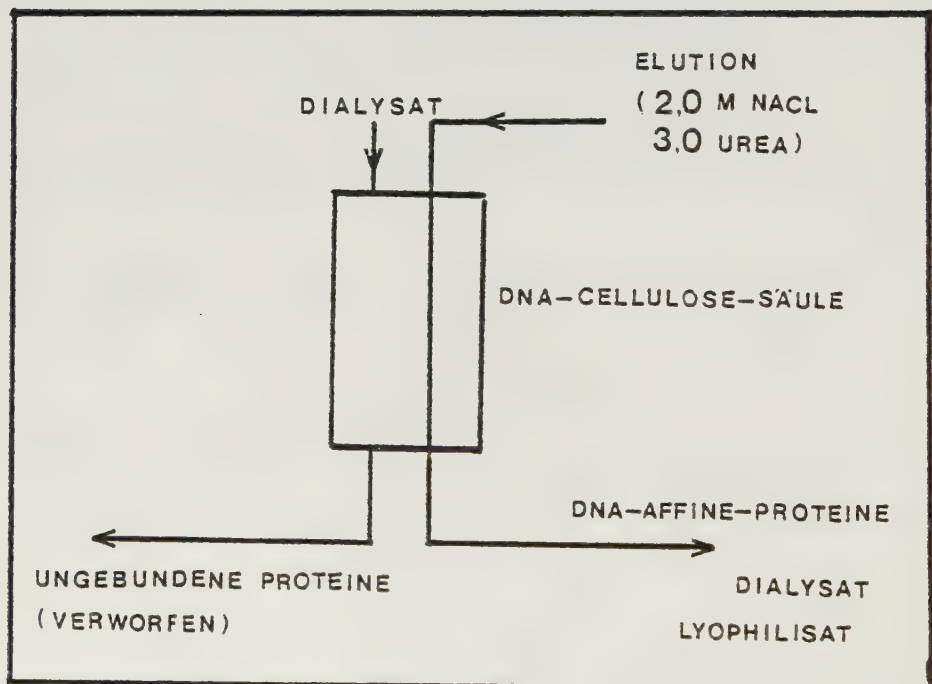
Abb. 1: Säulenchromatographie mit dem Anionenaustauscher QAE-Sephadex



Nach der Dialyse werden die negativen Proteine auf eine DNA-Cellulose-Säule gegeben. Diejenigen Proteine, die eine Affinität zu DNA besitzen binden sich an diese, die übrigen negativen Proteine werden ausgewaschen. Mit einer hohen Salzkonzentration werden die DNA-affinen-Proteine eluiert.

Das Eluat wird in einer Ultrafiltrationszelle gegen das 15-fache Volumen an destiliertem Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert (Abb. 2). Um eine Denaturierung der Proteine zu vermeiden, werden alle biochemische Vorgänge bei 4° C durchgeführt.

Abb. 2: Affinitätschromatographie mit DNA-Cellulose-Säule



4.3. QAE-Sephadex-Chromatographie

Eine Säule (Pharmacia) mit 2,5 cm Durchmesser wird 18 cm hoch mit QAE-Sephadex, einem basischen Anionenaustauscher, gefüllt und mit QAE-Waschpuffer äquilibriert. Danach werden langsam 5 ml Serum aufgetragen, um eine optimale Bindung der negativ geladenen Proteine zu erreichen. Mit QAE-Waschpuffer werden die positiv geladenen Proteine ausgewaschen, bis das Eluat frei von Proteinen ist. (Kontrolle der optischen Dichte bei 280 nm)

QAE-Waschpuffer:

10 mM Phosphatpuffer, pH 6,5
(NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4)

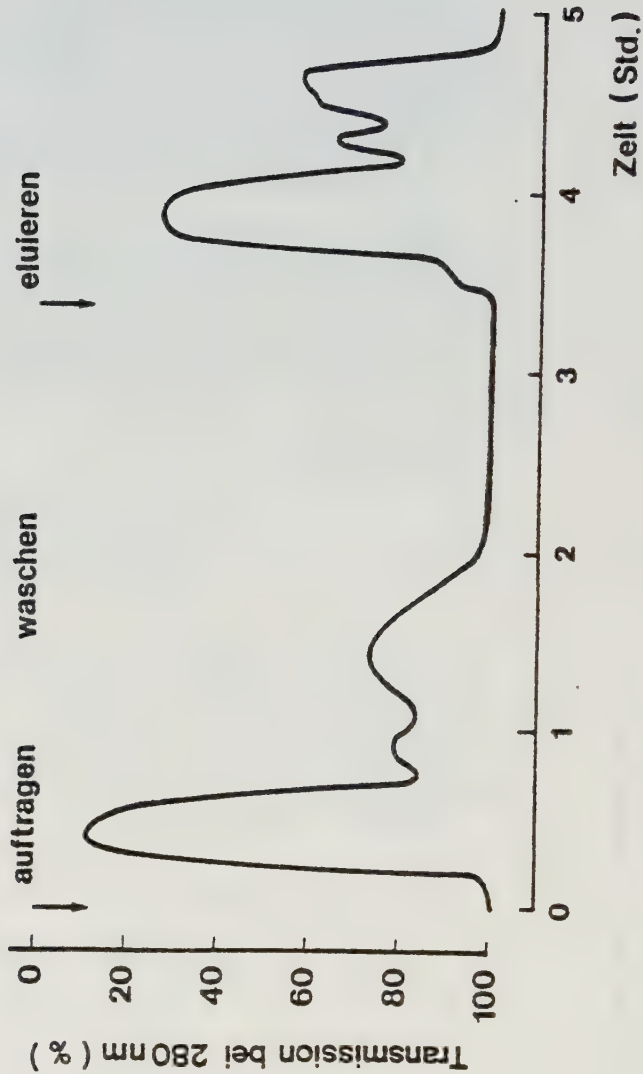
Die negativ geladenen Serumproteine werden mit QAE-Elutionspuffer abgelöst. Es entstehen drei charakteristische Proteinpeaks, die in Abb. 3 dargestellt sind.

QAE-Elutionspuffer:

10 mM Phosphatpuffer, pH 6,5
0,8 M NaCl

Das Eluat der negativ geladenen Proteine wird gegen das 7-fache Volumen des DNA-Cellulose-Waschpuffers in einer Ultrafiltrationszelle dialysiert.

Abbildung 3 Ionenaustauschchromatographie mit QAE-Sephadex zur Isolierung saurer Proteine



4.4. Isolierung der DNA-affinen-Proteine

Herstellung der DNA-Cellulose

Als Ausgangsprodukte werden benötigt:

- a) hochmolekulare, doppelsträngige Desoxyribonucleinsäure vom Kalbsthymus (Sigma)
- b) Cellulosepulver MN 2200 ff (Macherey u. Nagel)

Die Cellulose wird mit heißem Alkohol (70°C) pyridinfrei gewaschen und im Anschluß daran mit 0,1 M NaOH, 1 mM EDTA, 0,01 NaCl und H₂O equilibriert, getrocknet und lyophilisiert. Die Herstellung der DNA-Cellulose erfolgt nach Alberts et al (45,46).

1 g DNA wird in 400 ml 20 mM Tris (HCl) pH 7,4 mit 2 mM EDTA bei Zimmertemperatur in mehreren Tagen gelöst (Endkonzentration 2,5 mg DNA/ml).

Zu je 1 ml DNA-Lösung werden ca. 3 g gewaschene Cellulose gegeben. Das Gemisch wird auf einer flachen Schale zu einer Paste verrührt, bei Zimmertemperatur getrocknet und zusätzlich lyophilisiert.

Die pulverisierte DNA-Cellulose wird 4 mal in kurzen Abständen in 10 mM Tris (HCl), pH 7,4 mit 1 mM EDTA aufgeschwemmt und sedimentieren lassen, um ungebundene DNA zu entfernen. Das DNA-Cellulose-Gemisch wird nun bei - 70° C aufbewahrt.

4.5. Bestimmung der an Cellulose gebundenen DNA

Eine abgewogene Menge DNA-Cellulose wird mit 2 ml H_2O verdünnt, in kochendem Wasser 5 Minuten lang denaturiert und sofort wieder abgekühlt, um einzelsträngige DNA zu erhalten. Die Cellulose wird abzentrifugiert (25 min bei 4000 rpm) und im Überstand das Dekantat bei 260 nm Wellenlänge die Menge der abgelösten DNA bestimmt. Hierbei entspricht 1 mg einsträngiger DNA/ml Lösung einer Extinktion von 28.

Die DNA-Menge wird zu der Cellulose-Menge in Relation gesetzt, um die gebundene DNA quantitativ zu bestimmen. Je nach Präparation an DNA-Cellulose sind zwischen 1,8 und 2,5 mg DNA/g Cellulose gebunden.

Ist während der Versuche die Konzentration an DNA-Cellulose unter 1,2 mg DNA/g Cellulose gesunken, wurde die DNA-Cellulose verworfen. Somit war gewährleistet, daß stets mit einem Überschuß an DNA gearbeitet wurde.

4.6. Affinitätschromatographie mit DNA-Cellulose

Eine Säule (Pharmacia) mit 5 cm Durchmesser wird 6 cm hoch mit DNA-Cellulose gefüllt. Hierbei liegt die DNA im Überschuß vor, damit eine genügende Bindungskapazität für die DNA-affinen-Proteine vorhanden ist.

Es folgt eine Equilibrierung mit DNA-Waschpuffer, pH 6,8, bis das Eluat frei von DNA ist. (Kontrolle der optischen Dichte bei 260 nm). Anschließend wird das dialysierte QAE-Eluat langsam aufgetragen, um eine möglichst große Bindung der DNA-affinen-Proteine an die DNA-Cellulose zu ermöglichen.

Die nicht gebundenen positiv geladenen Proteine werden mit DNA-Waschpuffer entfernt.

DNA-Waschpuffer:

10 mM Phosphatpuffer, pH 6,8
1,0 mM EDTA

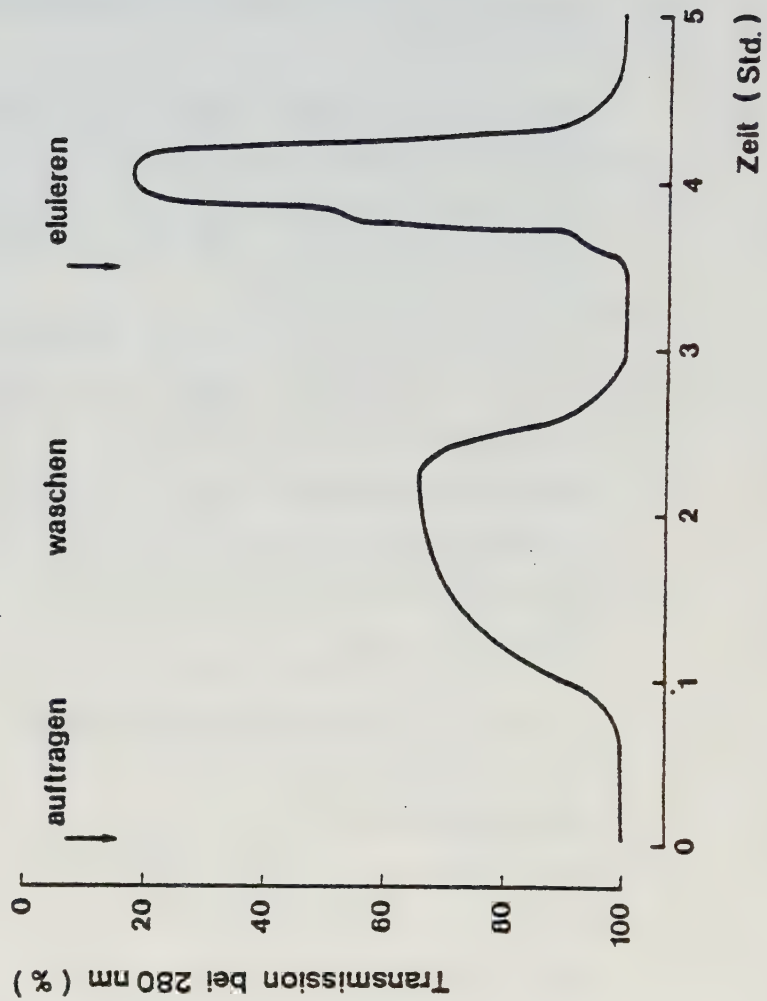
Die vollständige Entfernung ungebundener Proteine wurde durch Messen der optischen Dicht bei 280 nm Wellenlänge kontrolliert.

Mit hoher Salzkonzentration werden die an der DNA gebundenen Proteine in einem Schritt abgelöst und durch einen Schreiber, der mit dem Photometer verbunden ist (Abb. 4) als einen charakteristischen Peak registriert.

DNA-Elutionspuffer:

10 mM Phosphatpuffer, pH 6,8
1,0 mM EDTA
2,0 M NaCl
3,0 M Harnstoff

Abbildung 4 Affinitätschromatographie mit DNA-Cellulose zur Isolierung DNA-affiner-Proteine



Anschließend wird das Eluat mit einer Ultrafiltrationszelle (Amicon) gegen das 15-fache Volumen an dest. Wasser kontinuierlich dialysiert. Danach werden die Proteine lyophilisiert.

Das Lyophilisat wird mit dest. Wasser so gelöst, daß eine Proteinkonzentration von ca. 1 mg/ml resultiert.

Um standardisierte Arbeitsschritte und möglichst reproduzierbare Proteinisolierungen zu ermöglichen, wird in bestimmten Schritten der Arbeitsablauf standardisiert (Abb. 5).

Abbildung 5

Rationeller und standardisierter Arbeitsablauf durch Verschaltung der Säulen mit den anderen Elementen der Versuchsanordnung.

Legende zur Abbildung 5:

Schematische Darstellung des halbautomatischen Chromatographie-Systems.

Aus dem Serum werden über Weg "a" die basischen Proteine entfernt und danach über Weg "b" die DNA-affinen-Proteine isoliert.

I: Kühltank

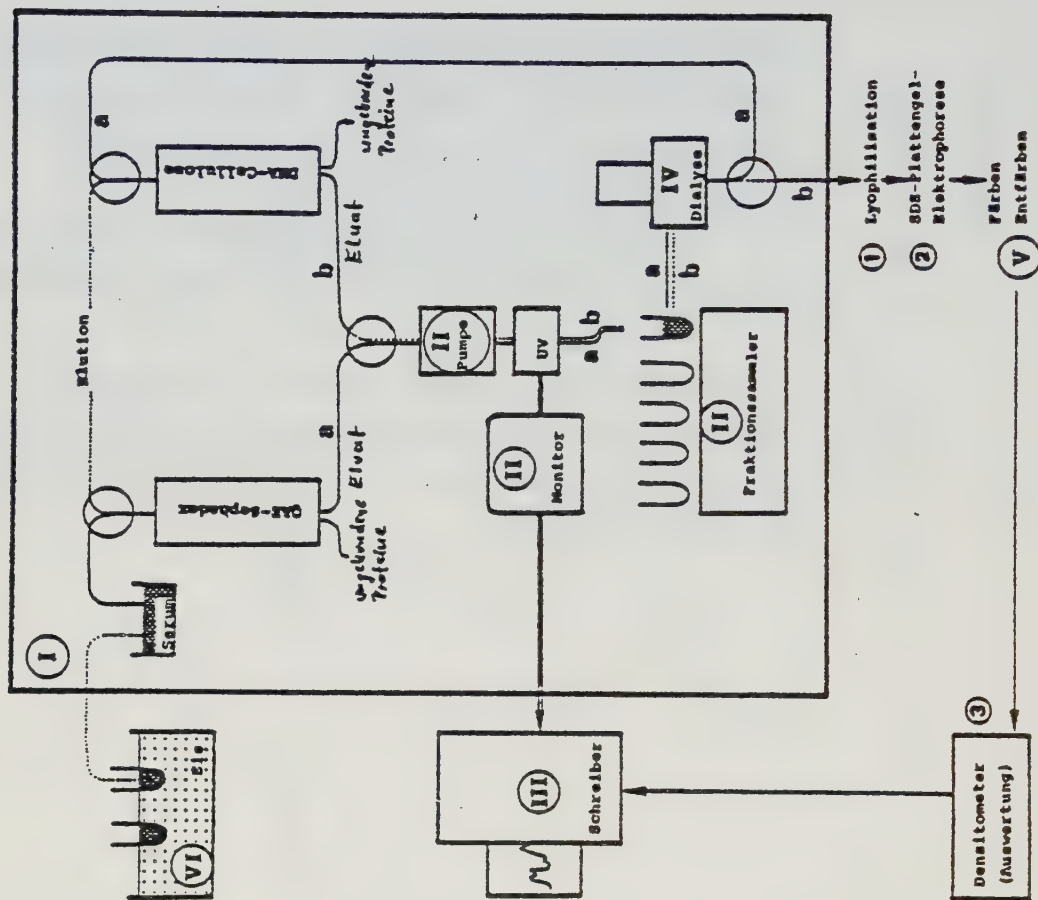
II: Chromatographieeinheit aus UV-Absorptionsmeßgerät, Fraktionsammler und Pumpe;

III: Einkanalsschreiber

IV: Eisbad

Weitere Geräte zur Darstellung der DNA-affinen-Proteine:

1. Lyophilisationsgerät; 2. Plattengel-Elektrophoreseapparat; 3. Densitometer.



4.7. Präparation der Plattengele nach Lämmli (47):

Pipetierschema des 11 %igen Trenngels:

Trenngelpuffer, pH 8,8

1,0 M Tris (HCl), pH 8,8

0,168 % SDS (Serva) 17,8 ml

Acrylamid-Stammlösung (Bio-Rad) 11,0 ml

Ammoniumpersulfat-Lösung (10 mg/ml)

(Bio-Rad) 1,2 ml

N,N,N,N - Tetramethyläthylendiamin (TEMED) 20 μ l

Das einpipetierte Gemisch wird im Vakuum entgast und in die Elektrophoreseglaskammer gefüllt. Danach wird das unpolymerisierte Acrylamid-Gemisch mit Wasser überschichtet, um eine gerade Trennfläche zwischen Trenngel und Sammelgel zu erreichen. Das polymerisierte Trenngel besitzt eine Trennstrecke von 6,5 cm und eine Breite von 10 cm. Anschließend wird das Sammelgel aufgetragen, wobei ein Probenlochformer so eingepaßt wird, daß eine Sammelgelstrecke von 1 cm resultiert.

Pipetierschema des 3,5 %igen Sammelgels:

Sammelgelpuffer, pH 6,8

165 mM Tris (HCl), pH 6,8

0,133 % SDS (Serva) 7,5 ml

Acrylamid-Stammlösung (Bio-Rad) 1,2 ml

Ammoniumpersulfat-Lösung 10 mg/ml (Bio-Rad) 1,5 ml

N,N,N,N - Tetramethyläthylendiamin (TEMED) 8 μ l

Nach dem Entfernen des Probenlochformers werden die entstandenen Löcher mit Elektrodenpuffer gefüllt.

Elektrodenpuffer:

25 mM Tris (HCl), pH 8,3
190 mM Glycin (Serva)
0,1 % SDS (Serva)

Parallel hierzu werden die Protein-Proben vorbereitet, indem 40-80 µl der zu untersuchenden Proteinlösung mit ca. 50-70 µg Protein mit 1/4 des Volumens an Inkubationspuffer versetzt werden.

Inkubationspuffer:

0,2 M Tris (HCl), pH 6,8
10 % SDS (Serva)
40 % Glycerin
0,01 % Bromphenolblau
15 % 2-Mercaptoäthanol (Serva)

Anschließend wird das Gemisch 5 min. auf 100°C im Wasserbad erhitzt und sogleich abgekühlt. Diese Proben werden vorsichtig in die Probenlöcher des Sammelgels pippetiert. Die Elektrophoreseglaskammern werden in ein Ortec Elektrophoresegerät gesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgt mit einem Ortec-4100 Stromgeber mit pulsierendem Gleichstrom nach folgendem Schema:

Zeit (Min.)	Volt (V)	Stromstärke (mA)	Pulsrate (P/sec.)	Kapazität (μ F)
0'	250	30	75	1,0
30'	250	65	150	1,0
35'	250	90	220	1,0
40'	250	130	300	1,0
60'	250	130	300	1,0
90'	250	130	300	1,0
105'	250	130	300	1,0
135'	260	130	300	1,0
165'	280	120	300	1,0
210'	280	120	300	1,0

Die Elektrophoresedauer beträgt ca. 2,5 bis 3 Stunden. Anschließend wird das Gel 45 Minuten in eine Färbelösung bei einer Temperatur von 60°C gefärbt. Die folgende Entfärbung dauert mehrere Tage, wobei mehrmals die Entfärbelösung gewechselt wird.

Färbelösung:

0,2 % Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva)
50 % Trichloressigsäure
1 % Methanol

Entfärbelösung:

10 % Essigsäure
7,5 % Methanol

Die Auswertung der Proteinbanden erfolgt mit einem Densitometer (Kipp & Zonen).

Als Marker diene:

a) ein Proteingemisch aus:

Cytochrom C (MG 12.300), Myoglobin (MG 17.000),
Carboanhydrase (MG 29.000), Aldolase (MG 40.000),
Katalase (MG 60.000).

b) ein Proteingemisch aus:

RNase (MG 13.700), Lactatdehydrogenase (MG 36.000),
Ovalbumin (MG 43.000), Phosphorylase b (MG 94.000)

c) ein Proteingemisch (Pharmacia) aus:

Thyreoglobulin (MG 330.000), Ferritin (MG 220.000)
Ferritinuntereinheiten (MG 18.500), Albumin (MG 67.000)
Katalase (MG 60.000), Lactatdehydrogenase (MG 36.000)

d) ein Proteingemisch (Bio-Rad) aus:

Myosin (MG 200.000), S-Galactosidase (MG 116.000),
Phosphorylase b (MG 94.000), Albumin vom Rinderserum
(MG 68.000), Ovalbumin (MG 43.000).

e) ein Proteingemisch (Bio-Rad) aus:

Phosphorylase b (MG 94.000), Albumin vom Rinderserum
(MG 68.000), Ovalbumin (MG 43.000), Carboanhydrase
(MG 29.000), Trypsin Inhibitor (MG 21.000),
Lysocym und Lactalbumin (MG 14.400)

f) ein Proteingemisch (Boehringer) aus:

RNase-Polymerase aus E. coli:

α -Untereinheit	39.000
β -Untereinheit	155.000
β' -Untereinheit	165.000

Albumin v. Rinderserum	68.000
------------------------	--------

Trypsin-Inhibitor aus

Sojabohne	21.000
-----------	--------

4.8. Proteinbestimmung nach Lowry (48)

Erstellung einer Eichkurve mittels Rinderserumalbumin (BSA) 1 mg/ml. In einer Doppelbestimmung werden jeweils 20 μ l Probe mit mM Tris (HCl), pH 7,2 aufgefüllt auf 200 μ l. Dazugegeben werden Folin-Reagenz und Reagenz C. Messen der Extinktion bei 740 nm Wellenlänge und den ermittelten Wert in Bezug setzen zu der tatsächlich aufgetragenen Menge.

5. Ergebnisse

5.1. Isolierung DNA-affiner-Proteine aus Humanserum

Die Isolierung der DNA-affinen-Proteine (DBP) aus Humanserum erfolgte nach der Methode von Maibach (23), wurde aber in wenigen Details geändert, um möglichst alle DBP zu isolieren. (vgl. Kap. Material u. Methoden). Unter diesen beschriebenen Bedingungen besitzen 0,3 - 0,6 % aller Serumproteine eine Affinität zur DNA.

Durch ein halbautomatisches Chromatographie-System (Abb. 5) und einen festgelegten Zeitplan, konnten DBP aus 4 - 5 Seren innerhalb von 5 Tagen isoliert werden. Dadurch konnten die DBP nicht nur schneller, sondern auch deutlich reproduzierbarer dargestellt werden. Die Reproduzierbarkeit dieses Systems zeigte sich bei Kontrollläufen, wobei dasselbe Serum zweimal aufgetrennt wurde (Tab. V, Pat. 5). In diesen Fällen gab es nur geringe Abweichungen, die im Schwankungsbereich der Methodik liegen.

Mit der modifizierten Methodik nach Maibach (23) und dieser reproduzierbaren Proteinisolierung war es möglich, insbesondere niedermolekulare DBP im MG-Bereich von 15.000 bis 30.000 zu einem quantitativ höheren Anteil und mit geringerer Streubreite zu isolieren.

Bei den Kontrollseren betrug die durchschnittliche Menge an DBP 0,8 µg DBP/ml Serum, mit einem Minimum

von 0,4 ug/ml und einem Maximum von 2,05 ug/ml.
Bei ca. 70 % betrug die Abweichung bis zu 0,3 ug/ml
aller Kontrollseren.

Die Patientenseren zeigten einen durchschnittlichen
Gehalt von 1,89 ug DBP/ml Serum.

Im Gegensatz zu den Kontrollseren zeigten die Pa-
tientenseren eine größere Streuung um den Mittelwert.
Im Bereich von 1,0 - 3,0 ug DBP/ml Serum sind über
60 % aller Patientenseren zu finden. Dies könnte mög-
licherweise auf einen unterschiedlich fortgeschrit-
tenen pathologischen Prozeß bei den MM-Patienten be-
ruhen, die bei diesem Wert subsummiert wurden.

Die isolierten DNA-affinen-Proteine eines Serums
zeigen eine für sie charakteristisches Proteinspektrum
im 11 %igem SDS-Polyacrylamid-Plattengel. Dieses Pro-
teinspektrum hat in einigen Banden individuelle quan-
titative Unterschiede, ist aber in den meisten Banden
mit den DBP von anderen Seren vergleichbar.
Dies ist besonders deutlich bei einer Proteinbande mit
einem Molekulargewicht von 68.000, die bei allen auf-
getrennten Seren, Patienten- sowie auch Kontrollseren,
in vergleichbarer Quantität vorkommt.

Diese Bande dürfte jedoch nicht Albumin darstellen.
Denn einmal wäre der Gehalt an Albumin in den Seren
sehr stark vermindert, zum anderen besitzt Albumin
nach Hofstee (44) bei den angewandten Bedingungen
keine Affinität zur DNA. Es handelt sich hier offen-
bar um ein DBP mit gleich großem Molekulargewicht
wie das Albumin.

5.2. Der R_{MM} -Wert

Untersucht wurden 48 DBP-Präparationen, darunter befanden sich 19 Seren von Gesunden, 23 Seren von MM-Patienten, 3 Seren von Patienten mit malignen bzw. semimalignen Tumoren sowie 3 Seren von Patienten mit einer generalisierten Dermatose (Tab. II, IV u. V). Bei allen Präparationen konnten DNA-affine-Proteine identifiziert werden, die ein zu dem von Parsons et al. (9,15) nachgewiesenen Molekulargewicht der Untereinheiten des DNA-affinen-Proteins C3DP aufweisen. Ob dieses Protein mit dem DBP C3DP von Parsons et al. (9,15) identisch ist, wurde mangels Vergleichsproben nicht näher untersucht.

Die zuvor angewendete Methode zur Darstellung der Proteine in einem SDS-Polyacrylamid-Plattengel und die anschließende Auswertung der Gele mit einem Densitometer ist aus folgenden Gründen ungenau:

- a) das inhomogen entfärbte Gel
- b) die Trägheit, der mit dem Densitometer gekoppelten Schreibeinheit
- c) die Varianz der aufgetragenen Proteinmenge, die bei einer Proteinbestimmung bei ca. ± 3 % liegt.

Hierdurch korreliert die densitometrische Peakhöhe einer Proteinbande nicht genau mit der Proteinmenge. Um diese Fehlerquellen zu reduzieren und die Quantität der Proteine in den verschiedenen Seren vergleichen zu können, wurde die Isolierungsmethodik

standardisiert und ein relatives Maßsystem erarbeitet.

Durch ein halbautomatisches Isolierungsverfahren konnten besonders niedermolekulare DBP im MG-Bereich von 15.000 bis 30.000 zu einem quantitativ höherem Anteil und mit geringerer Streubreite isoliert werden. Außerdem wurde die Polyacrylamid-Konzentration der Gele so gewählt, daß die DBP mit einem MG von 10.000 bis 30.000 etwa ein Drittel der gesamten Laufstrecke des Gels beanspruchten.

In diesem Bereich kann nun ein DBP mit einem MG von 22.000 deutlicher dargestellt werden, das sowohl bei Kontrollseren, wie auch bei den Seren von MM-Patienten vorkommt. Weiterhin wurde eine Proteinbande mit einem MG von 68.000 als Relationsparameter herangezogen, die bei Patienten- als auch bei Kontrollseren, in vergleichbarer Intensität vorhanden ist. Von beiden dargestellten DBP mit MG 22.000 und 68.000 wurde die densitometrische Peakhöhe in Relation gesetzt und der resultierende Quotient wird als R_{MM} -Wert bezeichnet:

$$R_{MM} = \frac{\text{Peakhöhe der DBP mit MG 68.000}}{\text{Peakhöhe der DBP mit MG 22.000}}$$

Da das SDS-Polyacrylamid-Plattengel nach der Anfärbung der Proteine nicht gleichmäßig entfärbt wird, entspricht die densitometrische Basislinie des Gels nicht einer Nulllinie. Um jedoch die reale Peakhöhe festlegen zu können, wurde die Nulllinie bei den gleichzeitig aufgetrennten Markerproteine bestimmt (Abb. 6). Es wurde von der Überlegung ausgegangen,

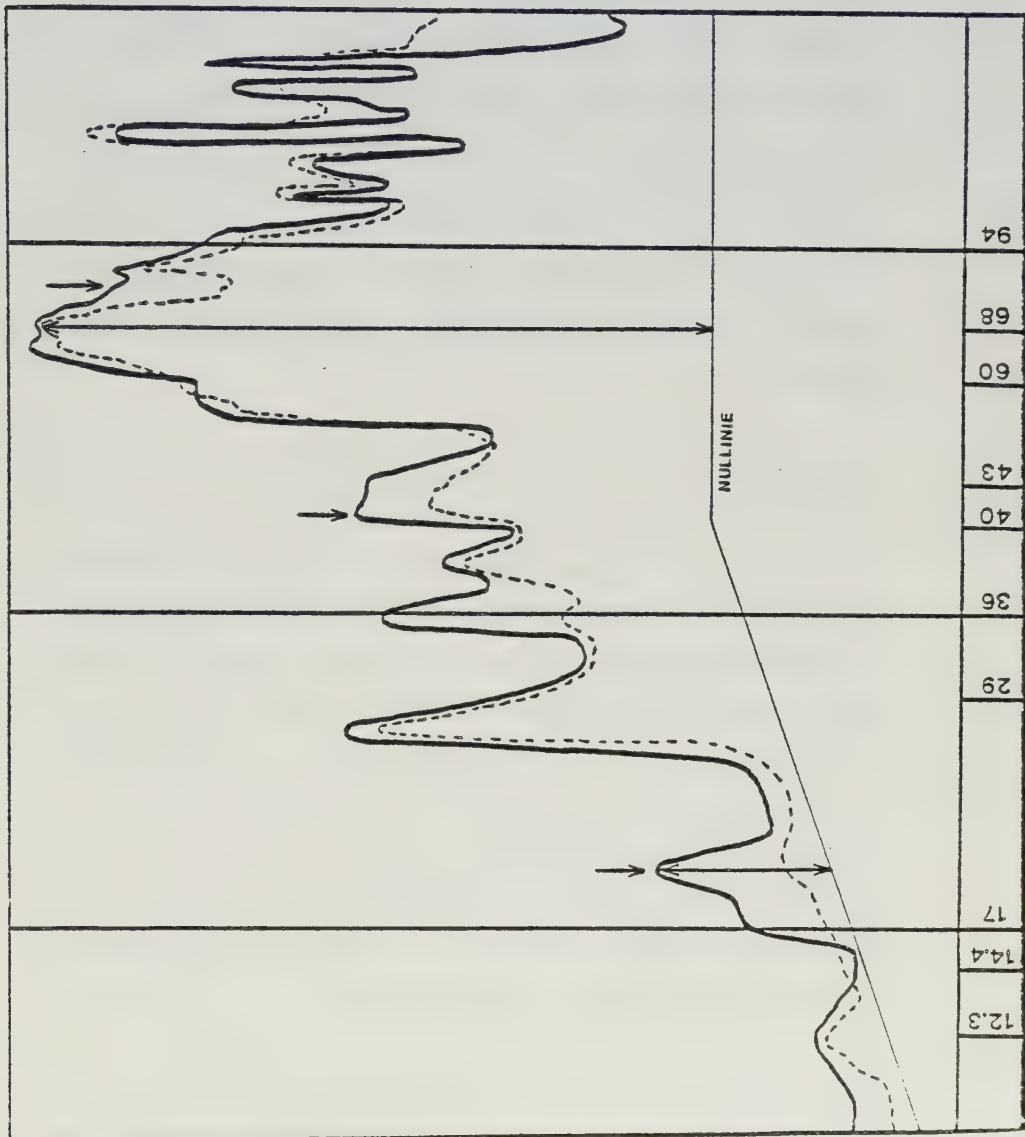
daß im Markergemisch zwischen den einzelnen Banden die Grundfärbung des Gels vorhanden ist.

Diese Grundfärbung zwischen den Proteinbanden des Markers wurde dann für die im gleichen Gel aufgetrennten DBP-Präparationen als Nulllinie angenommen und somit die reale Peakhöhe bestimmt.

Die mit dem Densitometer gekoppelte Schreibeinheit hatte so die Möglichkeit zwischen den relativ weit auseinanderliegenden Markerbanden die reale Nulllinie zu schreiben. Dies ist bei den dicht aufeinanderfolgenden Banden der DBP-Seren nicht möglich, so daß die Nulllinie graphisch nicht ersichtlich ist.

Abbildung 6

Densitometrische Darstellung eines Kontrollserums (-----) und eines Patientenserums (—) mit realer Peakhöhe (↑↓). Die Nulllinie wurde nach der densitometrischen Auswertung des Markergemisches gefunden (——). Erhöhte Konzentration charakteristischer DBP bei den MM-Patientenserum gegenüber den Kontrollserum (↓).



5.3. Der R_{MM} -Wert der Kontrollseren

Untersucht wurden 19 Seren von Gesunden, beiderlei Geschlechts und im Alter von 20 - 40 Jahren (Tab. II). Die elektrophoretisch dargestellten Proteinspektren der isolierten DBP stimmen in den starken Proteinbanden weitgehend überein. Dies wird durch die densitometrische Auswertung verifiziert. Die Abweichungen der schmalen Banden sind individueller Natur. Sie konnten weder dem Alter, dem Geschlecht noch der Blutgruppe der Kontrollperson zugeordnet werden. Seren derselben Kontrollpersonen, die zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen wurden, zeigten hingegen nur geringe Variationen bezüglich der schmalen Banden.

Entsprechend den Ergebnissen von Parsons et al. (9,15) konnten bei der densitometrischen Darstellung der Kontrollseren in geringen Mengen drei Proteinbanden identifiziert werden. Diese dürften in ihrem Molekulargewicht von 22.000, 40.000 und 74.000 mit den drei Untereinheiten des C3DP korrelieren (Abb. 6). Die Proteine mit dem MG von 40.000 und 74.000 sind jedoch wegen der gewählten Polyacrylamid-Konzentration nicht so eindeutig zu identifizieren wie die Bande mit dem MG von 22.000. Wegen der guten Darstellbarkeit dieser Bande wurde sie als Referenzprotein für den R_{MM} -Wert herangezogen.

Bei allen untersuchten Kontrollseren erwies sich der R_{MM} -Wert einschließlich der chromatographischen und

elektrophoretischen Schwankungsbreite größer als 8,5 (Tab. II, Abb. 7).

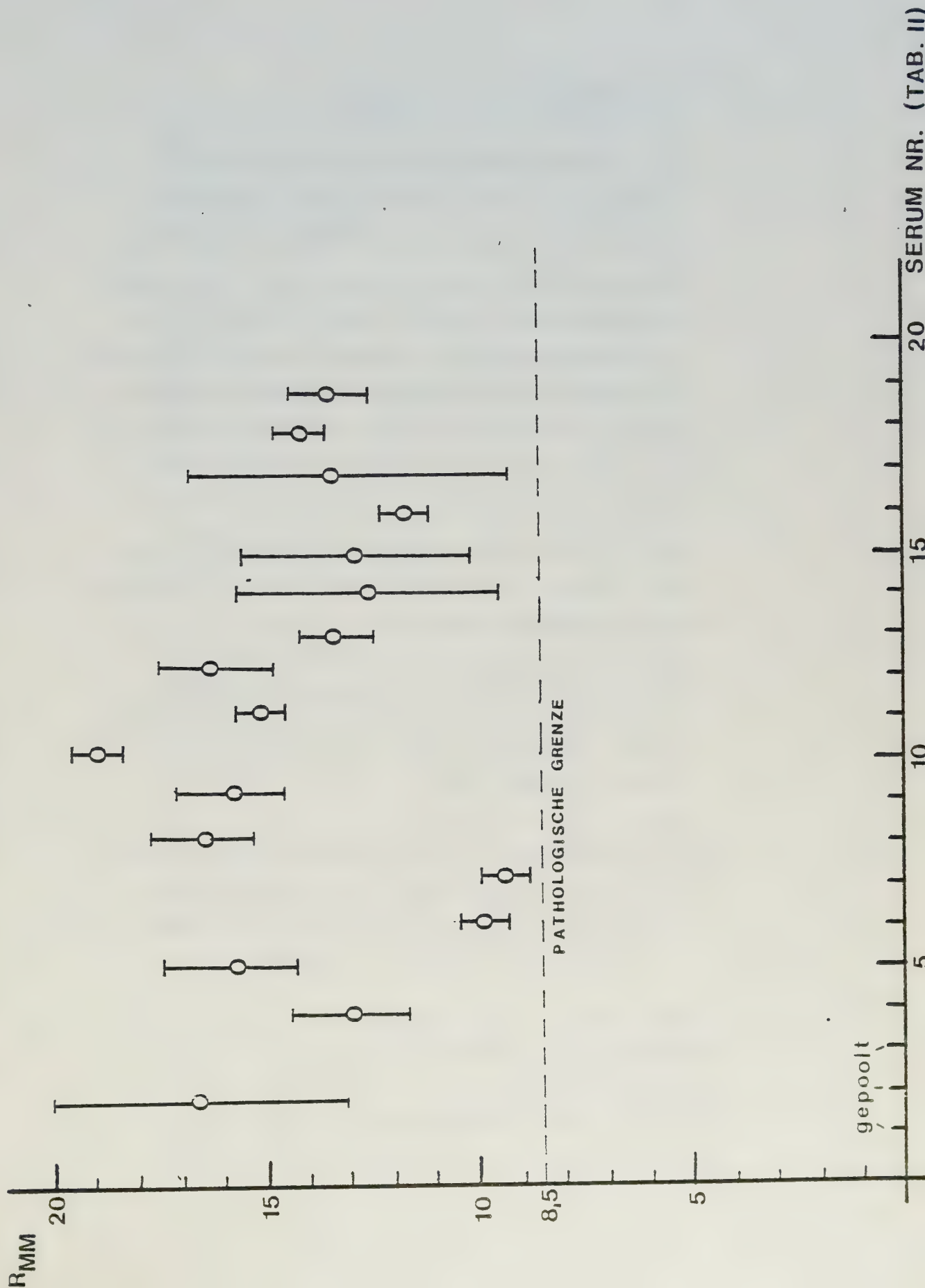
Im Durchschnitt beträgt der R_{MM} -Wert aller Kontrollseren 13,9. Der höchste R_{MM} -Wert eines Kontrollserums beträgt 18,8. Der niedrigste liegt bei 9,3 und entspricht dem höchsten Gehalt an dem DNA-affinen-Protein mit MG von 22.000.

Tabelle II Der R_{MM} -Wert der Kontrollseren

Nr. des Serums	R_{MM} -Wert	Nr. des Serums	R_{MM} -Wert
1	gepoolt 16,75	11	14,7
2		12	16,1
3		13	13,15
4		14	12,55
5		15	12,85
6		16	11,85
7		17	13,05
8		18	13,7
9		19	13,35
10			

Durchschnittlicher R_{MM} -Wert aller Kontrollseren: 13,9

Abbildung 7: Graphische Darstellung des R_{MM} -Wertes der Kontrollseren



5.4. Der R_{MM} -Wert der Patientenserum

Zur Verfügung standen 23 Seren von insgesamt 22 Patienten unterschiedlichen Alters und beiderlei Geschlechts (Tab. IV). Zur Kontrolle der methodischen Genauigkeit wurden von einem Patienten zwei Seren, die im kurzen Abstand entnommen worden waren, aufgetrennt. Die Patienten waren an einem der drei Melanomarten erkrankt. Untersucht wurden überwiegend Melanome der histologischen Tumor-Level III bis V. Lediglich Patient Nr. 12 (Tab. IV) hatte ein Melanom mit Tumor-Level I und Patient Nr. 16 einen Tumor mit Level II.

Bei allen Patienten erfolgte die Blutentnahme kurz vor, während oder maximal 1 Monat nach der Operation des Primärtumors (Tab. IV).

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der isolierten DBP im 11 %igem SDS-Polyacrylamid-Plattengel und der densitometrischen Auswertung ergaben sich folgende Beobachtungen:

1. In den Seren der an MM erkrankten Patienten sind im Vergleich zu den Kontrollseren verschiedene Banden verstärkt, d.h. daß diese DNA-affinen-Proteine vermehrt vorliegen (Abb. 6.).

Dies ist besonders deutlich bei den Banden mit einem MG von ca. 22.000 und MG 40 - 43.000. Auch Proteine mit MG 74.000 sind ähnlich wie von der Arbeitsgruppe Parsons et al. (9,15) beschrieben, vermehrt zu erkennen.

Ausgenommen von den obigen Resultaten ist das Serum des Patienten Nr. 12 mit einem MM-Level I (Tab. IV), in dem kein vermehrter Gehalt der oben genannten DBP festzustellen ist. Gegenüber den Kontrollseren ergab die densitometrische Darstellung keine Schwankungen bei den starken Banden. Lediglich die schmalen Banden zeigen Abweichungen, die aber offensichtlich wie bei den Kontrollseren individuell bedingt sind.

2. Bei der Bewertung der Patientenseren mit dem relativen Maßsystem wurde festgestellt, daß alle Patienten-Seren einen kleineren R_{MM} -Wert hatten als 8,5 (Tab. IV, Abb. 8). Sie sind somit gut von den Kontrollseren abzugrenzen (R_{MM} -Wert der Kontrollseren größer als 9,0) (Tab. II, Abb. 7).

Dies bedeutet nach der Definition des R_{MM} -wertes, daß bei den Personen, die an MM des histologischen Tumor-Levels II bis V erkrankten, eine vermehrte Menge des DNA-affinen-Proteins mit einem MG von 22.000 vorliegt.

3. Gliedert man die Patienten-Seren nach dem histologischen Tumor-Level und errechnet den durchschnittlichen R_{MM} -Wert eines Levels, so kann wegen der Schwankungsbreite des Maßsystems keine statistische

signifikante Aussage getroffen werden.

4. Läßt man den Tumor-Level außer acht und bewertet die MM-Art, so ergeben sich, bei Nichtberücksichtigung des Patienten Nr. 12 (Tab. IV, Abb. 8) mit Tumor-Level I, in der Tendenz zwar Unterschiede, jedoch mit einer relativ großen Streubreite. Es wäre eine höhere Anzahl an Seren notwendig um eine signifikante Aussage machen zu können.

Tab. III: durchschnittlicher R_{MM} -Wert bei den drei Melanomarten.

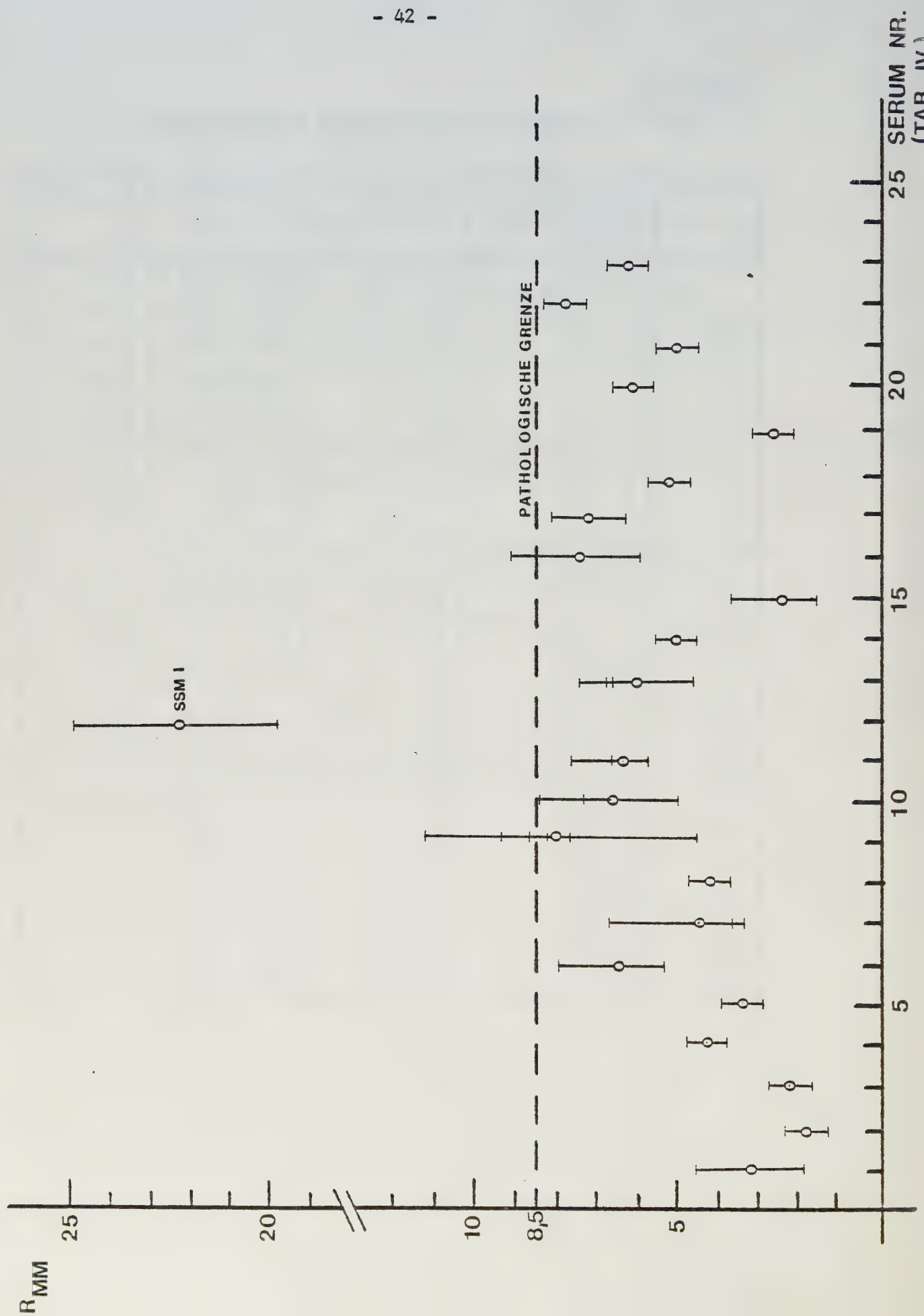
Anzahl der Pat.-Seren	Melanomart	R_{MM} -Wert
3	LMM	4,0 $\pm$ 0,94
5	SSM	5,8 $\pm$ 1,2
9	NM	4,75 $\pm$ 2,04

Tabelle IV

Der R_{MM} -Wert bei Seren von Patienten mit malignem Melanom

Patient	Geschlecht/ Alter bei Blut- entnahme	MM-Art/hist. Tumorlevel	Blutentnahme	R_{MM} -Wert
1	m / 52	NM / IV	sofort nach OP	3,16
2	m / 51	NM / III-IV	sofort nach OP	1,95
3	m / 51	NM / III-IV	sofort nach OP	2,23
4	w / 71	LMM/ IV	sofort nach OP	4,30
5	m / 73	SSM/ IV	während der OP	3,38
6	w / 67	SSM/ IV	sofort nach OP	6,6
7	m / 59	NM / III	sofort nach OP	4,53
8	m / 36	MM / IV-V	1 Monat nach OP	4,22
9	w / 39	NM / IV	sofort nach OP	8,11
10	w / 74	NM / III-IV	1 Monat nach OP	6,77
11	w / 28	SSM/ III	sofort nach OP	6,59
12	w / 57	SSM/ I	sofort nach OP	22,2
13	w / 24	NM / IV	sofort nach OP	6,2
14	w / 33	SSM/ III-IV	sofort nach OP	5,29
15	m / 76	SSM+LMM /IV	sofort nach OP	2,58
16	m / 56	SSM / II	1 Monat nach OP	7,45
17	w / 33	NM / III	sofort nach OP	7,18
18	w / 45	LMM/ III	sofort nach OP	5,12
19	w / 49	NM / IV	sofort nach OP	2,7
20	m / 67	MM / IV-V	sofort nach OP	6,32
21	m / 39	MM / IV	sofort nach OP	5,0
22	w / 69	MM / III	sofort nach OP	8,1
23	w / 23	MM / III	sofort nach OP	6,7

Abbildung 8: Graphische Darstellung des R_{MM} -wertes der MM-Patientenseren



5.5. Der R_{MM} -Wert bei Seren von Patienten mit anderen Dermatosen

Stichprobenartig wurden Seren von Patienten mit anderen Erkrankungen untersucht (Tab. V).

Drei Patienten hatten einen malignen bzw. semimalignen Tumor (Tab. V, Pat. 2, 3 u. 4), zwei Patienten litten an einer generalisierten Dermatose (Tab. V, Pat. 1 u. 5).

Der R_{MM} -Wert brachte folgende Ergebnisse:

1. Die beiden Patienten (Pat. 1 u. 5) die an einer Kälte-Urtikaria bzw. einer Dermatomyositis erkrankt waren, haben einen R_{MM} -Wert, der im Bereich des R_{MM} -Wertes der Kontrollseren liegt. Der Wert liegt somit über 8,5 (Tab. V).
2. Der an einem Talgdrüsenkarzinom erkrankte Patient (Tab. V, Pat. 2), dessen Blut 8 Tage vor der Operation entnommen wurde, hat einen R_{MM} -Wert von 7,26 und liegt somit unterhalb der Normalgrenze von 8,5. Jedoch ist er nicht so niedrig wie im Durchschnitt bei Patienten, die an einem Melanom erkrankt waren.

Auch der Patient mit einem Basaliom (Tab. V, Pat. 3), einem semimalignen Tumor, liegt mit einem R_{MM} -Wert von 5,18 im pathologischen Bereich.

3. Unklar ist der Fall des Patienten 4 (Tab. V, Pat. 4).

Laut Karteieinsicht lag bei diesem Patienten ein Schweißdrüsenkarzinom vor. Vier Tage vor der Operation wurde Blut entnommen und ein R_{MM} -Wert von 13,7 ermittelt.

Fünf Monate nach der Operation wurden in der klinischen Untersuchung Metastasen festgestellt. Nach den Ergebnissen von Parsons et al. (9,15) und den Resultaten dieser Arbeit dürfte sich dieser Patient mit seinem R_{MM} -Wert nicht in der Gruppe der Kontrollpersonen befinden, sondern sein R_{MM} -Wert müßte unter 8,5 liegen.

Tabelle V

Der R_{MM} -Wert von Patienten, die an einer generalisierten Dermatoze oder an einem anderen malignen Tumor litten.

Patient	Geschlecht/Alter bei Blutentnahme	Diagnose	Blutentnahme	R_{MM} -Wert
1	m / 39	Kälte-Urtikaria	keine OP	14,44
2	m / 71	Talgdrüsenkarzinom	8 Tage vor OP	7,26
3	w / 87	Basaliom	2 Tage vor OP	5,18
4	w / 58	Schweißdrüsen- karzinom	4 Tage vor OP	13,76
5a	w / 67	Dermatomyositis	keine OP	21,9
5b	w / 67	Dermatomyositis	keine OP	20,25

6. Diskussion

Die Arbeitsgruppe Parsons et al. (9,15) konnte in Seren von Patienten mit verschiedenen malignen Tumoren eine höhere Konzentration eines DNA-affinen Proteins nachweisen als in Seren von Gesunden. Es handelt sich hierbei um eine Variante der Komplement-Komponente C3, die zur DNA eine Bindungsaffinität besitzt. Dieses Protein wird als C3DP bezeichnet und setzt sich aus drei Untereinheiten mit MG von 74.000, 40.000 und 22.000 zusammen.

Von diesem Ergebnis ausgehend wurde untersucht, ob in Seren von Patienten mit einem malignen Melanom ebenfalls eine erhöhte Konzentration an charakteristischen DBP vorhanden ist.

Die Seren wurden nach der Methode von Maibach (23) und Parsons et al. (9,15) bei geringer Modifikation aufbereitet. Darüberhinaus wurde durch eine standardisierte Arbeitsmethodik die Gewinnung der DBP reproduzierbarer (Abb. 5).

Um Unterschiede bei charakteristischen DNA-affinen Proteinen von Kontroll- und Patientenseren vergleichen zu können ist zur Auswertung ein relatives Maßsystem, der R_{MM} -Wert, entwickelt worden. Hierbei konnten Fehlerquellen verringert werden, indem die densitometrisch dargestellte Proteinbanden zueinander in Relation gesetzt wurden. So konnten Ungenauigkeiten der angewendeten Methodik wie Abweichungen der Proteinmenge, unterschiedliche Anfärbungen etc. eliminiert werden.

Nach Darstellung und Auswertung der Proteinspektren der Kontrollseren konnten in allen Präparationen DNA-affine-Proteine identifiziert werden, die in ihrem Molekulargewicht dem von Parsons et al. (9,15) nachgewiesenen Untereinheiten des DNA-affinen-Proteins C3DP entsprechen. Bedingt durch eine unterschiedliche Isolierungsmethode und mangels Vergleichsproben wurde nicht näher untersucht ob das dargestellte DBP mit dem C3DP von Parsons et al. (9,15) übereinstimmt.

Durch Anwendung des relativen Maßsystems, dem sogenannten R_{MM} -Wert, läßt sich feststellen, daß der Gehalt des DBP mit einem MG von 22.000 bei allen Kontrollseren eine bestimmte Grenze nicht überschreitet (Tab. II, Abb. 7). Auch Parsons et al. (9,15), die ein absolutes Meßsystem in Form radioaktiver Antikörper benutzen konnten, kamen zu dem Ergebnis, daß das DBP C3DP in allen Kontrollseren eine bestimmte Quantität im Serum nicht übersteigt. Der R_{MM} -Wert bezieht sich nur auf das DBP mit MG 22.000, erfaßt also nicht die beiden anderen Untereinheiten des C3DP mit MG 74.000 und 40.000. Hierauf wurde aus methodischen Gründen verzichtet; ohnehin wäre beim Vorliegen des C3DP mit einer stöchiometrischen Korrelation zu rechnen.

Die Schwankungen des R_{MM} -Wertes bei den Kontrollseren von 9,0 bis 18,8 (Tab. II, Abb. 7) ließ sich weder durch das Alter, dem Geschlecht oder der Blutgruppe der Kontrollpersonen begründen. Die Schwankungen des R_{MM} -Wertes von Seren derselben Kontrollperson, die zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen wurden, sind hingegen so gering, daß sie vernach-

lässigt werden können. Der R_{MM} -Wert des Serums Gesunder stellt sich somit als ein individueller Wert dar. Analog diesen Beobachtungen hat auch die Arbeitsgruppe von Parsons et al (9,15) mit einem absoluten Maßsystem eine entsprechend große Schwankungsbreite zu verzeichnen.

Mit Hilfe dieses standardisierten Isolierungs- und Auswertungssystems konnten die Kontrollseren direkt mit den Patientenseren verglichen werden. Es wurde versucht, MM-Patienten mit definierten, vergleichbaren Parametern auszuwählen, um eine Aussage über ein größeres MM-Patientgut treffen zu können. Bei allen Patienten wurde entweder kurz vor oder bis maximal einen Monat nach der Operation Blut entnommen. In allen Fällen betraf die Operation die Exzision des Primärtumors; es sind keine Patienten darunter, die sich einer Rezidivoperation unterzogen haben. Eine immuno- bzw. chemotherapeutische Behandlung ist an keinem Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme oder zuvor durchgeführt worden.

Somit ergaben sich bei der Gegenüberstellung der Kontrollen mit den Patientenseren folgende Charakteristika:

In den Patientenseren konnten wie in den Kontrollseren DNA-affine-Proteine nachgewiesen werden, die in ihrem Molekulargewicht den Untereinheiten des C3DP (Parsons et al. (9,15)) ähnlich sind. Schon der Vergleich der Elektrophoresegele von Kontroll- und Patientenseren verdeutlichte, daß bestimmte

Proteinbanden in den Patientenseren verstärkt vorhanden sind. Dies entspricht einer Vermehrung an den jeweiligen DNA-affinen-Proteine (Abb. 6). Durch die gewählte Polyacrylamidkonzentration ist dies insbesondere an der Bande mit einem MG von 22.000 gut zu erkennen.

Nach densitometrischer Darstellung und Ermittlung des R_{MM} -Wertes können die Patientenseren klar von den Kontrollseren abgegrenzt werden. Erstreckt sich der R_{MM} -Wert der Patientenseren von 1,95 bis zu 8,11 bei einem Mittelwert von 5,2 und einer Standardabweichung von 1,65 (Tab. IV, Abb. 8), so ist der niedrigste R_{MM} -Wert der Kontrollseren 9,3, der höchste 18,8 mit einem Mittelwert von 13,9 und einer Standardabweichung von 1,9 (Tab. II, Abb. 7). R_{MM} -Werte zwischen 8,5 und 9,0 scheinen somit den Übergang vom pathologischen zum normalen Bereich darzustellen (Abb. 7 und 8).

Analog fanden Parsons et al. (9,15) einen Grenzwert den sie mit 150 μ g C3DP/ml Serum angeben. Eine höhere Konzentration als 150 μ g/ml Serum deutet die Arbeitsgruppe als Indikator für einen malignen Tumor. Andererseits schließen die Autoren bei einer normalen Konzentration von C3DP im Serum weitgehend ein Karzinom aus.

Eine Ausnahme von den obigen Resultaten macht das Serum des Patienten Nr. 12 (Tab. IV, Abb. 7). Dieser Patient litt an einem SSM mit dem Tumor-Level I. Sein R_{MM} -Wert liegt im Bereich der Kontrollseren.

Folgt man der Auffassung von Dermatologen die den Level I als nicht pathogen ansehen, so reiht sich der R_{MM} -Wert des Levels I in das Gesamtergebnis ein.

Stichprobenartig wurden R_{MM} -Werte bei Patienten mit anderen dermatologischen Erkrankungen und Tumoren ermittelt. Die an einer Kälte-Urtikaria bzw. Dermatomyositis erkrankten Patienten Nr. 1 und 5 (Tab. V) haben einen R_{MM} -Wert, der den Werten der Kontrollseren entspricht.

Der R_{MM} -Wert des Patienten Nr. 2 (Tab. V), der an einem Talgdrüsenkarzinom litt, liegt im Bereich der Werte der MM-Patienten. Auch der Basaliompatient Nr. 3 (Tab. V) hat einen R_{MM} -Wert, der mit 5,28 deutlich unter dem der Kontrollgruppe liegt.

Bei einem Patienten mit Schweißdrüsenkarzinom wurde ein R_{MM} -Wert bestimmt, der mit 13,7 in etwa dem Durchschnittswert aller Kontrollpersonen entspricht (Pat. Nr. 4, Tab. V). Bei diesem Patient wurde vier Tage vor der Operation Blut entnommen. Fünf Monate nach der Operation wurden in der klinischen Untersuchung Metastasen festgestellt. Nach unseren Beobachtungen wäre hier ein R_{MM} -Wert unter 8,5 zu erwarten gewesen; es muß angenommen werden, daß sich der Patient schon bei der Operation in einem fortgeschrittenem Stadium befunden hatte.

Auch die Arbeitsgruppe Hoch et al. (12), die eine ähnliche Methodik wie die Arbeitsgruppe Parsons et al. (9,15) benutzte, fand nicht bei allen Karzinomarten eine Vermehrung an charakteristischen DBP. Bei etwa 64 % der untersuchten verschiedenen Karzinomarten konnte eine Erhöhung an C3DP festgestellt werden, die anderen Karzinomarten erbrachten Werte die im normalen Bereich liegen. Die Ergebnisse von Hoch und Parsons et al. (9,12,15) sowie die Resultate dieser Arbeit weisen darauf hin, daß insbesondere für das maligne Melanom die Erhöhung charakteristischer DNA-affiner-Proteine im Blutserum ein sicherer klinisch-chemischer Indikator ist. Bereits bei Level II (Tab. IV, Pat. 16) wurde ein R_{MM} -Wert im pathologischen Bereich ermittelt. Bei der guten Prognose dieses Levels ist durch den R_{MM} -Wert eine Möglichkeit zur Früherkennung des malignen Prozesses gegeben.

Auch scheint die Bewertung von erhöhten DBP im Humanserum dem biochemischen Nachweis des Carcino-embryonic-Antigens (CEA) und dem alpha-Fetoprotein als Indikator für das Vorliegen eines malignen Tumors überlegen zu sein (11,24,57-61). Denn Parsons und Hoch et al. (9,12,15) fanden nur erhöhte Werte von C3DP bei Patienten mit Malignomen. CEA und alpha-Fetoprotein kann auch bei nichtmalignen Erkrankungen nachgewiesen werden (24,57). Eine stichprobenartige Untersuchung der Seren von Patienten mit generalisierten Dermatosen (Tab. V, Pat. 1 und 5) ergab keinen R_{MM} -Wert, der im pathologischen Bereich liegt.

7. L i t e r a t u r

- 1) Malignant Melanoma and Vitiligo
T. Jour. of Invest. Derm. 73, 491-494 (1979)
- 2) Gartmann, H.:
Ergebnisse histologischer Untersuchungen-Ent-
stehung des malignen Melanoms
Der Hautarzt 14.Jahrgang,
- 3) Sylven, B.:
Acta radiol. (Stockholm) 32, (1949)
zit. nach Soder und Ott
- 4) Clark, W.H.Jr.; From, L; E.A. and Mihm, M.C.:
The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary
Human Malignant Melanomas of the Skin
Cancer Res. 29, 705-726 (1969)
- 5) Hermanek, P.; Hornstein, O.P.; Tonak, J. und
Weidner, F.:
Malignes Melanom. Invasionstiefe und Melanomtyp
Beitr. Path. Bd. 157, 269-282 (1976)
- 6) Heite, H.J.:
Malignes Melanom
Langenbecks Archiv für Chirurgie 342
- 7) Hundeiker, M.:
Dt. Ärzteblatt, 36, (1979)

- 8) Kokoschka, E-M.; Micksche, M. und Cerni, C.:
Immunotherapie beim malignen Melanom (Aktive
spezifische und aktive unspezifische Immun-
stimulierung)
Wiener klinische Wochenschrift 88 (21), 690-696
(1976)
- 9) Parsons, R.G. and Hoch, J.A.:
Purification and Identification of a Human-Serum
DNA-Binding Protein Associated with Malignant
Diseases
Eur.J.Biochem. 71, 1-8 (1976)
- 10) Parsons, R. J.; Longmire, R.L.; Hoch, S.O. and
Hoch, J.A.:
A Clinical Evaluation of Serum C3DP Levels in
Individuals with Malignant Diseases
Cancer Res. 37, 692-695 (1977)
- 11) Chu, T.M., and Nemoto, T.:
Evaluation of carcinoembryonic antigen in human
mammary carcinoma
J. Natl. Cancer inst. 51 : 1119-1122 (1973)
- 12) Hoch, S.O.; Longmire, R.L. and Hoch, J.A.:
Unique DNA-binding protein in the serum of patients
with various neoplasms
Nature Vol. 255, 560-562 (1975)
- 13) Brehm, S.P.; Hoch, S.O. and Hoch, J.A.:
DNA-Binding Proteins in Human Serum
Biochemical and Biophysical Res. Communications 63,
No. 1, 24-32 (1975)

- 14) Reimer, G.; Maibach, M. and Leonhardi, G.:
DNA-Binding Proteins in the Sera of Patients with
Malignant Melanoma
Arch. Dermatol. Res. 264, 265-273 (1979)
- 15) Parsons, R.G.; Hoch, J.A. and Longmire, R.L.:
A Correlation of Serum C3DP Levels with Chemo-
therapeutic Managment of Cancer Patients
Cancer 41, 2099-2106 (1978)
- 16) Nakazaki, H.; Mitomi, T.; Tajima, T.; Ogoshi, K.;
Sugihara, T.; Nakano, H. and Katsunuma, T.:
Serum DNA-Binding Protein in Cancer Patients
Proceedings of the 38th annual meeting of the
Japanese
Cancer Association, held in Tokio, Japan, Sept. 1979.
Japanese Cancer Association, Tokio, Japan, 321 PP.,
(1979)
- 17) Katsunuma, T.; Tsuda, M.; Kusumi, T.; Ohkubo, T., Mitomi,
T., Nakasaki, H., Tajima, T.; Yokoyama, S.; Kamiguchi,
H.; Kobayashi, K. and Shinoda, H.:
Purification of a Serum DNA-Binding Protein (64DP)
with a Molecular Weight of 64.000 and its Diagnostic
Significance in Malignant Diseases
Biochem. Biophys. Res. Commun. 93 (2), 552-557 (1980)
- 18) Kowal, R. and Parsons, R.G.:
Visualization of new DNA-Binding Proteins (DNA-BPS) in
Plasma form Cancer Patients
Cancer Res. 21, 8 (1980)

- 19) Hughes A.E.; Lowry, W.S.; Hill, J.A. and Davies R.J.:
The two-Dimensional Electrophoresis of Human-Serum
DNA-Binding Proteins
Biochem. Soc. Trans. 7 (5), 1089-1090 (1979)
- 20) Galvan, L.; Huang, C.H. and Crooke, S.T.:
Detection of a DNA-Binding Protein present in
decreased Amounts in the Sera of Patients with
Malignancies
Cancer Res. 20 , 429 (1979)
- 21) Parsons, R.G. and Kowal, R.:
Detection of a new malignancy-associated DNA-Binding
Protein in Human Serum
Cancer Res.: 19, 99 (1978)
- 22) Schroder, C.; Weinblum, D. and Zahn, R.K.:
Malignancy-Associated DNA-Binding Protein C3DP from
Human-Serum: Further Characterization and Purification
of C3DP
Retaining in DNA-Binding Affinity
Physiol. Chem. 360 (3), 370 (1979)
- 23) Maibach, M.:
Charakteristische DNA-affine Proteine in Seren von
Patienten mit malignem Melanom
Inaugural-Dissertation, Johann-Wolfgang-Goethe-Univer-
sität Frankfurt am Main (1978)
- 24) Holyoke, D., Reynoso, G. and Chu, T.M.:
Carcinoembryonic antigen (CEA) in patients with
carcinoma of the digestive tract
Ann. Surg. 176:559-564 (1972)

- 25) Einhorn, L.H.; Burgess, M.A.; Vallejos, C.; Bodey, G.P.Sr.; Gutterman, J.; Mavligit, G.; Hersh, E.M.; Luce, J.K.; Frei, E.; Freireich, E.J. and Gottlieb, J.A.:
Prognostic Correlations and Response to Treatment
in Advanced Metastatic Malignant Melanoma
Cancer Res. 34, 1995-2004 (1974)
- 26) Luce, J.K.:
Chemotherapie of Malignant Melanoma
Cancer 30, 1604-1615 (1972)
- 27) Bast, R.C.Jr.; Zba, B.; Borsos, T. and Rapp, H.J.:
BCG and Cancer (First of two Parts)
N. Engl. J. Med. 290, 1413-1420 (1974)
- 28) Faraci, R.P.; Barone, J.J.; Marrone, J.G. and Schour, L.:
Brief Communication: In Vitro Evidence of Specific
BCG-Induced Immunity to Malignant Melanoma in
BALB/c Mice
J. Natl. Cancer Inst. 52, 1913-1915 (1974)
- 29) Morton, D.L.; Eilber, F.R.; Holmes, E.C.; Hunt, J.S.; Ketcham, A.S.; Silverstein, M.J. and Sparks, F.C.:
BCG Immunotherapy of Malignant Melanoma: Summary of
a Seven-year Experience
Ann. Surg. 180, 635-643 (1974)
- 30) Brandes, L.J.; Galton, D. and Wiltshaw, E.:
New approach to immunotherapy of melanoma
Lancet ii, 293-295 (1971)

- 31) Curtis, J.E.;
Adaptive immunotherapy in the treatment of
advanced malignant melanoma
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 12, 52 A (1971)
- 32) Lawrence, H.S.:
The Transfer In Humans Of Delayed Skin Sensitivity
To Streptococcal M Substance And To Tuberculin
With Disrupted Leucocytes
J. Clin. Invest. 34, 219-230 (1955)
- 33) Lawrence, H.S.; Al-Askari, S.; David, J.; Franklin,
E.C. and Zweiman, B.:
Transfer Of Immunological Information In Humans With
Dialysates Of Leucocyte Extracts
Trans. Assoc. Am. Phys. 76, 84-91 (1963)
- 34) Lawrence, H.S. and Pappenheimer, A.M.:
Effect of specific antigen on release from humans
leucocytes of the factor concerned in the transfer
of delayed hypersensitivity
J. Clin. Invest. 36, 908 (1957)
- 35) Levin, A.S.; Spitler, L.E.; Wybran, J.; Byer, V.S.
and Fudenberg, H.H.:
Treatment Of Osteogenic Sarcoma (OS) With Tumor
Specific Dialysable Transfer Factor (TF)
Clin. Res. 21, 648 A (1973)
- 36) Lo Buglio, A.F.; Neidhart, J.A.; Hilberg, R.W.;
Metz, E.N. and Balcerzak, S.P.:
The Effect of Transfer Factor Therapy on Tumor
Immunity in Alveolar Soft Part Sarcoma
Cell. Immunol. 7, 159-165 (1973)

- 37) Morse, P.A.Jr.; Deraps, G.D.; Smith, G.V.; Raju, S.
and Hardy, J.D.:
Transfer Factor Therapy of Human Cancer
Clin. Res. 21, 71 A (1973)
- 38) Tompson, R.B.:
Lymphocyte Transfer Factor
Eur. J. Clin. Biol. Res. 16, 201-204 (1971)
- 39) Ghose, T.; Norvell, S.T.; Guela, A.; Cameron, D.;
Bodurath, A. and Mac Donald, A.S.:
Immunochemotherapy with Chlorambucil-Carrying antibody
Brit. Med. J. 3, 195-199 (1972)
- 40) Gutterman, J.U.; Mavligit, G.; Gottlieb, J.A.; Burgess,
M.A.; Mc Briede, C.E.; Einhorn, L.; Freireich, E.J. and
Hersh, E.M.:
Chemoimmunotherapy of disseminated malignant melanoma
with dimethyl triazeno imidazole carboxamide and bacillus-
Calmette-Guérin
New. Engl. J. Med. 291, 592-597 (1974)
- 41) Newlands, E.S.; Oon, C.J.; Roberts, J.T.; Elliot, P.;
Mould, R.F.; Toham, C.; Madden, F.J.F.; Newton, K.A.
and Westbury, G.:
Clinical Trial Of Combination Chemotherapy And Specific
Active Immunotherapy In Disseminated Melanoma
Br. J. Cancer 34, 174-179 (1976)
- 42) Brehm, S.P.; Hoch S.O. and Hoch, J.A.:
DNA-binding proteins in human serum
Biochem. biophys. Res. Commun. 63, 24-31 (1975)

- 43) Hoch, S.O.; Longmire, R.L. and Hoch, J.A.:
Unique DNA-binding protein in the serum of
patients with various neoplasms
Nature 255, 560-562 (1975)
- 44) Hofstee, B.H.J.:
Solubility and Composition of protein-desoxyri-
bonucleic acid complexy
Biochem. Biophys. Acta 91, 340-343 (1964)
- 45) Alberts, B.M.; Amodio, F.J.; Jenkins, M.; Gutmann,
E.D. and Ferris, F.L.:
Studies with DNA-Cellulose Chromatography
I. DNA-binding proteins from E. coli.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33, 289-304
(1968)
- 46) Alberts, B.M. and Herrick, G.:
Methods in Enzymology XXI
Teil D, 198 (1971)
- 47) Laemmli, U.K.:
Cleavage of Structural Proteins during the Assembly
of the Head of Bacteriophage T4
Nature 227, 680-685 (1970)
- 48) Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall,
R.J.:
Kolorimetrische Proteinbestimmung mit dem Folin'schen
Phenolreagenz
J. Biol.Chem. 193, 265-275 (1951)

- 49) Allen, A.C. and Spitz, S.:
Malignant melanomas, a clinico-pathologic analysis
of the criteria for diagnosis and prognosis
Cancer 6, 1-45 (1953)
- 50) Breslow, A.:
Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma
Ann. Surg. 172, 902-908 (1970)
- 51) Lane, N.; Lattes, R. and Malm, J.:
Clinicopathological Correlations in a Series of 117
Malignant Melanomas of the Skin of Adults
Cancer 11, 1025-1043 (1958)
- 52) Mc Govern, V.I.:
The classification of malignant melanoma and its
histologic reporting
Cancer 32, 1446-1457 (1973)
- 53) Mehnert, J.H. and Heard, J.L.:
Staging of Malignant Melanoma by Depth of Invasion
Am.J.Surg. 110, 168-176 (1965)
- 54) Petersen, N.C.; Bodenham, D.C. and Lloyd, O.C.:
Malignant Melanomas of the Skin
Brit. J. Plastic Surg. 15, 49-94 (1962)
- 55) Trapl, J.; Palecek, L.; Ebel, J. and Kucers, M.:
Tentative New Classification of Melanoma of the
Skin
Acta Dermato-Venerol. 46, 443-446 (1969)

- 56) Wanebo, H.J.; Woddruff, J. and Fortner, J.G.:
Malignant Melanoma Of The Extremities: A Clinico-
pathologic Study Using Levels of Invasion (Microstage)
Cancer 35, 666-676 (1975)
- 57) Laurence, D.J.R.; Stevens, U.; Bettelheim, R.;
Darcy, D.; Leese, C.; Tuberville, C.; Alexander,
P.; Johns, E.W. and Neville, A.M.:
Role of plasma carcinoembryonic antigen in diagnosis
of gastrointestinal, mammary, and bronchial carci-
noma
Br. Med. J. 3:605-609 (1972)
- 58) Matsumoto, Y.; Suzuki, T.; Ono, H.; Nakasa, A. and
Honjo, I.:
Response of alpha-fetoprotein to chemotherapy in
patients with hepatomas
Cancer 34 : 1602-1606 (1974)
- 59) Skarin, A.T.; Delwiche, R.; Zamchek, N.; Lokich,
J.J. and Frei, E.:
Carcinoembryonic antigen: Clinical correlation with
chemotherapy for metastatic gastrointestinal cancer
Cancer 33 : 1239-1245 (1974)
- 60) Steward, A.M.; Nixon, D.; Zamcheck, N. and Aisen-
berg, A.:
Carcinoembryonic antigen in breast cancer patients:
Serum levels and disease progress.
Cancer 33 : 1246-1252 (1974)

61) Vincent, R.G. and Chu, T.M.:

Carcinoembryonic antigen in patients with carcinoma
of the lung

J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 66 : 320-328 (1973)

Herrn Prof. Dr. med. G. Leonhardi danke ich für
die Überlassung des Themas.

Herrn Dr. Dr. G. Reimer für die Unterstützung und
Beratung bei der Durchführung der chemischen Unter-
suchungen sowie für die freundliche Hilfe beim
Anfertigen der Dissertation.

Lebenslauf

Am 27. Februar 1955 wurde ich als Sohn des Kraftfahrers Jakob Gräff und dessen Ehefrau Margot Gräff, geb. Bilska, in Hähnlein, Landkreis Darmstadt, geboren.

Von 1961 bis 1965 besuchte ich die Volksschule in Hähnlein, anschließend das Schuldorf Bergstrasse in Seeheim a.d. Bergstrasse. Dort ging ich 1970 mit Erreichen des Realschulabschlusses ab um einen Beruf zu erlernen. In der Zeit von 1970 bis 1973 wurde ich bei der Deutschen Bausparkasse in Darmstadt zum Bankkaufmann ausgebildet. Während dieser Zeit besuchte ich die kaufmännische Berufsschule Martin-Beheim in Darmstadt.

Von Juli 1973 bis Januar 1974 war ich bei der Deutschen Bausparkasse als Bankkaufmann tätig. Das Hessenkolleg Rüsselsheim, ein Institut des zweiten Bildungsweges zur Erlangung der allgemeinen Hochschulzulassung besuchte ich mit Erfolg von 1974 - 1976.

Im Wintersemester 1976/77 begann ich das Studium der Zahnmedizin an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt am Main.

Im Frühjahr 1979 legte ich hier das Physikum ab, zur Zeit befinde ich mich im 10. Fachsemester.

Frankfurt am Main, den 12. 1. 1982

Jacob Gräff

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

"Vermehrung typischer DNA-bindender Proteine im Serum von Patienten mit malignem Melanom"

im Zentrum der Dermatologie und Venerologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. G. Leonhardi mit Unterstützung durch Herrn Dr. Dr. G. Reimer ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main , den 12. 1. 1982

Bened Gieß

